

Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder Utama Ekstrak Etanol Kulit Batang Tumbuhan Mangrove (*Avicennia* spp.)

Isolates The Main Secondary Metabolites of Ethanol Extract of Mangrove (*Avicennia* spp.) Bark

Darminto¹⁾, Alimuddin Ali²⁾, Iwan Dini^{3)*}.

^{1), 3)} Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Makassar. Jl. Daeng Tata Raya, Makassar 90224

²⁾ Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Makassar. Jl. Daeng Tata Raya, Makassar 90224

Received 4 Januari 2012 / Accepted 17 Januari 2012

ABSTRAK

Pengujian secara *in vitro* ekstrak etanol kulit batang tumbuhan *Avicennia* spp. secara terfraksinasi menunjukkan aktivitas antibakterial yang tinggi. Ujiantang formula ekstrak menunjukkan viabilitas ikan uji lebih tinggi. Penelitian lanjutan dilakukan untuk menemukan senyawa utama sebagai senyawa kandidat fitofarmaka, sebelum melakukan formulasi fitofarmaka untuk produk yang terstandarisasi untuk tujuan komersial kedepan. Metode yang digunakan adalah metode penelusuran menggunakan teknik kromatografi lapis tipis dan kromatografi kolom. Identifikasi senyawa utama dilakukan melalui analisis berdasarkan data hasil uji kimia dan data spektrum dari pengukuran spektroskopi. Senyawa metabolit sekunder utama diperoleh berupa senyawa polar golongan alkaloid berbentuk serbuk kristal berwarna putih dengan titik leleh 172°C dengan berat molekul 232 dan rumus molekul $C_{12}H_{12}N_2O_3$.

Kata kunci: Metabolit sekunder utama, mangrove, *Avicennia* spp.

ABSTRACT

In vitro examine of fractionated ethanol extract of bark Mangrove (*Avicennia* spp). showed high antibacterial activity. Repression test of extract formula showed that fish has a higher viability. Recent study has conducted to find the main compound as candidate prior to standardized product of phytopharmaka for future commercial purposes. The chromatography methods was applied and identification of major compounds by analysis

*Korespondensi:
email: iwandini@yahoo.com

based on chemical test as well as spectral data of spectroscopic measurements. Study showed that main secondary metabolites in the form of alkaloid class of polar compounds. The white crystalline powder form characteristics has a melting point 172°C with molecular weight 232, and molecular formula is $C_{12}H_{12}N_2O_3$.

Key words: Main secondary metabolites, mangrove, *Avicennia* spp.

PENDAHULUAN

Tumbuhan mangrove merupakan salah satu tumbuhan tropis yang berpotensi dikembangkan untuk penanggulangan penyakit infeksi pada ikan budidaya, karena belum banyak digunakan untuk orientasi ekonomi dari senyawa bioaktif yang dikandungnya. Upaya untuk mendapatkan senyawa bioaktif dari sumber daya laut terus digalakkan, seperti pencarian senyawa bioaktif antibakterial pada spons laut (Linington, dkk, 2002) dari siput bakau (Alimuddin dan Rante, 2006) telah dilakukan, namun potensi senyawa pada tumbuhan mangrove sebagai kandidat fitofarmaka budidaya perairan yang dapat memiliki potensi farmakologi sebagai antimikrobia belum banyak dikaji.

Tumbuhan mangrove di Indonesia merupakan yang terbanyak di dunia, baik dari segi kuantitas area ($\pm 42.550 \text{ km}^2$) maupun jumlah spesies (± 45 spesies) (Spalding, 2001). Sebagian besar dari tumbuhan mangrove digunakan sebagai bahan obat. Ekstrak dan bahan mentah dari tumbuhan mangrove telah digunakan oleh masyarakat pesisir untuk keperluan pengobatan alamiah. Kandungan saponin triterpenoid dari *Acanthus illicifolius* menunjukkan aktivitas leukimia, paralysis, asma, rematik serta anti peradangan; dan alkaloid dari *Antrioleks vesicaria* juga berkhasiat sebagai senyawa bakterisida (Purnobasuki, 2004).

Penelitian terhadap ekstrak metanol dari batang tumbuhan bakau jenis *Rhizophora* spp mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji *Vibrio harveyi* dan ekstrak metanol dari pelepah nipah juga mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji (Alimuddin dan Linda, 2007). Uraian tersebut menunjukkan potensi tanaman mangrove untuk diarahkan dalam mengkaji pemanfaatan sumber daya laut yang berpotensi farmakologik.

Uji ekstrak tumbuhan mangrove spesies *Avicennia* sp. menunjukkan daya hambat yang besar terhadap bakteri *Aeromonas hydrophyla* (Darminto, dkk, 2009a). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tumbuhan mangrove *Avicennia* spp. berpotensi dikembangkan untuk penanggulangan penyakit MAS (*Motile Aeromonads Septicemia*) atau sering disebut penyakit bercak merah ikan (*red spot disease*). Penyebab utama penyakit ini adalah bakteri *A. hydrophyla*. Beberapa senyawa murni yang memiliki aktivitas antibakterial terutama terhadap kelompok bakteri *Aeromonas* spp. yang diuji secara *in vitro* (Angka, 2002).

Aktivitas penghambatan yang cukup tinggi senyawa murni tersebut khususnya diperoleh dari tumbuhan *Avicennia* spp. dengan tingkat toksisitas rendah dengan uji menggunakan *cell vero* (Darminto, dkk, 2009b). Komponen bioaktif dari *Avicennia* spp. ini memiliki nilai $IC_{50} > 200 \text{ } \mu\text{g/ml}$, viabilitas ikan uji lebih tinggi dengan

konsentrasi senyawa bioaktif 15-25 g/kg pakan dan berbeda nyata dengan 1-10 g/kg pakan pada Uji BNT 1%. Komponen-komponen bioaktif dari tumbuhan mangrove tersebut berpotensi digunakan sebagai kandidat fitofarmaka (Darminto, dkk, 2010).

Senyawa metabolit sekunder sebagai senyawa komponen bioaktif yang ditemukan belum memberikan informasi mengenai senyawa yang paling berperan sebagai senyawa metabolit sekunder utama. Dengan demikian, penelitian ini dilakukan untuk menelusuri senyawa tersebut.

METODE

1. Ekstraksi

Kulit batang *Avicennia* spp. yang sudah dihaluskan dan dikeringkan sebanyak 2,80 kg dimaserasi selama 24 jam sebanyak 3 kali pada suhu kamar masing-masing dengan 10 liter etanol. Hasil maserasi setelah disaring menggunakan penyaring Buchner dan dievaporasi pada tekanan rendah diperoleh maserat sampai ekstrak kering sebanyak 12,80 g ekstrak kental.

2. Fraksinasi dan Purifikasi

Ekstrak etanol dari kulit batang *Avicennia* spp. ditimbang sebanyak 10,90 g kemudian diimpreknasi dengan silikagel kasar. Sampel yang sudah diimpreknasi kemudian di fraksinasi menggunakan Kolom Kromatografi Vakum (KKV) diameter 7,0 cm dengan fasa diam silika gel G GF₂₅₄ 100 g dan eluen n-heksan, n-heksan : etil asetat, etil asetat, kloroform, aseton, dan metanol dengan kepolaran yang terus ditingkatkan dan diperoleh 28 fraksi. Fraksi-fraksi yang diperoleh kemudian

dikromatografi lapis tipis (KLT). Berdasarkan pola KLT, fraksi yang mempunyai pola noda dan nilai RF (*retention flow*) yang mirip digabung sehingga diperoleh tujuh fraksi gabungan utama. Data penelitian sebelumnya diperoleh bahwa fraksi aktif yang dimaksudkan adalah fraksi gabungan utama B dari hasil fraksinasi ekstrak etanol kulit batang *Avicennia* spp. Fraksi ini sebelumnya diketahui yang paling berpotensi untuk dikembangkan sebagai sediaan fitofarmaka berdasarkan penelusuran senyawa bioaktif dan uji efektifitas melalui uji tantang dalam menentukan persen sintas atau viabilitas ikan uji (Darminto, dkk, 2010).

Fraksi B ekstrak etanol kulit batang *Avicennia* spp. diuji pendahuluan dengan uji KLT dengan tujuan untuk mengetahui teknik yang tepat digunakan untuk proses purifikasi lebih lanjut. Hasil uji KLT dengan berbagai perbandingan eluen berbagai jenis pelarut didapat yang paling sesuai untuk memisahkan komponen utama fraksi B, yaitu pelarut etil asetat dan n-heksan dengan perbandingan 2:8. Pada uji KLT juga diperoleh kromatogram yang menunjukkan adanya senyawa yang berpendar dibawa sinar lampu UV 256.

Dengan eluen etil asetat : n-heksana (2:8), sebanyak 0,90 g fraksi B kemudian difraksinasi dengan teknik kromatografi kolom tekan (KKT) menggunakan adsorben silika G 60 230-400 mesh sebagai fasa diam diperoleh beberapa fraksi. Berdasarkan kemiripan noda dan RF pada kromatogram hasil KLT diperoleh sembilan fraksi utama gabungan. Analisis lebih lanjut pada fraksi gabungan utama B₈ menunjukkan satu noda pada kromatogram

hasil KLT dan terdapat noda yang berpendar biru dibawa lampu UV 256 nm. Setelah dievaporasi diperoleh padatan bercampur kristal jarum berwarna putih dengan berat 0,47 g. Padatan ini kemudian direkristalisasi dengan menggunakan pelarut n-heksana untuk menghilangkan zat pengotor, kemudian direkristalisasi kembali menggunakan pelarut kloroform dan diperoleh isolat berupa kristal putih berbentuk jarum dengan berat 0,1297 g.

Isolat yang diperoleh sebagai komponen utama yang ditelusuri ada pada fraksi B₈ karena pada fraksi B₈ hampir 80% berat ekstrak hasil fraksinasi terdapat pada fraksi tersebut, pada kromatogram hasil KLT terdapat noda yang berpendar biru dibawah sinar lampu UV 256 nm, kromatogram hasil KLT hanya terdapat tiga noda yang menunjukkan ada tiga komponen senyawa penyusun pada fraksi B₈. Lebih lanjut kristal murni yang diperoleh setelah rekristalisasi beratnya hampir 50% dari berat keseluruhan fraksi B₈ jika dihitung berdasarkan persentase komposisi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Identifikasi Senyawa

a. Uji Kimia

Fraksi B ekstrak etanol kulit batang *Avicennia* spp. diuji pendahuluan dengan uji kimia menggunakan uji pereaksi. Uji pereaksi bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung di dalam fraksi B tersebut. Pada uji ini, digunakan pereaksi antara lain pereaksi Liberman Buchard, Dragendorff, FeCl₃ dan Wagner. Hasil pengujian diperoleh bahwa fraksi B paling dominan menunjukkan

reaksi positif terhadap pereaksi Dragendorff yang artinya positif terhadap adanya kandungan alkaloid. Hasil pengujian ini juga mengindikasikan bahwa komponen utama atau konsentrasi tertinggi dalam fraksi B adalah alkaloid. Pengujian positif alkaloid ini dapat dilihat dari perubahan warna sampel setelah ditambahkan pereaksi Dragendorff yaitu dari coklat menjadi orange sampai ada endapan coklat.

Uji kimia lebih lanjut dilakukan pada isolat yang diisolasi pada fraksi B yaitu fraksi B₈. Uji yang dilakukan berupa uji kelarutan, uji kemurnian dengan uji titik leleh dan analisis KLT tiga sistem eluen. Hasil uji kimia menunjukkan bahwa pada uji kelarutan, isolat larut sempurna pada pelarut etil asetat, kloroform lebih lambat, dan tidak larut dalam pelarut n-heksan. Uji kelarutan menunjukkan bahwa senyawa yang diperoleh adalah senyawa yang cukup polar karena dapat larut dalam pelarut polar seperti etil asetat dan tidak larut dalam pelarut nonpolar. Uji KLT dengan sistem tiga eluen menunjukkan satu noda dan berpendar biru dibawa sinar lampu UV 256 nm yang menunjukkan bahwa isolat memiliki kromofor atau elektron bebas yang terkonyugasi. Satu noda pada tiga sistem eluen yaitu masing-masing pada nilai R_f 0,35 eluen etil asetat : n-heksana 3:7, R_f 0,73 eluen etil asetat : kloroform 8:2, dan R_f 0,58 eluen aseton : n-heksana 3:7, mengindikasikan bahwa isolat yang diisolasi ini adalah senyawa murni. Didukung oleh pengukuran titik leleh isolat yaitu 172-173°C, dengan rentang 1°C mengindikasikan tingkat kemurnian isolat yang diperoleh sebagai senyawa murni (Doyle dan Mungal, 1986).

Pengujian isolat lebih lanjut menggunakan pereaksi Dragendorff menunjukkan hasil adanya reaksi positif terhadap pereaksi Dragendorff dengan perubahan warna isolat dari coklat menjadi orange dan terbentuk endapan coklat. Dengan demikian isolat dipastikan mengandung senyawa alkaloid.

b. Pengukuran Spektroskopi

Identifikasi lebih lanjut dilakukan dengan pengukuran spektroskopi GC-MS sekaligus penentuan senyawa utama dalam isolat dan dilanjutkan pengukuran spektroskopi inframerah (IR). Hasil pengukuran diperoleh berupa spektrum GS-MS dan spektrum serapan IR kedua spektrum dapat dilihat dalam Darminto (2011).

1) GC-MS

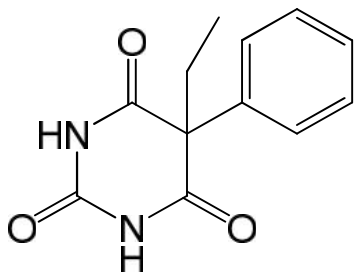
Pengukuran dengan GC-MS isolat yang diperoleh pada fraksi B₈ menunjukkan ada empat puncak serapan yang menunjukkan bahwa pada isolat masih terdapat empat komponen. Munculnya empat puncak serapan pada kromatogram kemungkinan disebabkan adanya keisomeran senyawa yang dapat dilihat dari kecilnya perbedaan waktu retensi dari keempatnya. Dari kromatogram tersebut terdapat satu puncak yang paling dominan dilihat dari persen komposisinya yaitu 63,44%. Puncak serapan dominan ini merupakan puncak serapan yang ketiga dengan waktu retensi 18.535 menit pada spektrum dan merupakan senyawa utama yang terkandung dalam isolat. Pengukuran lanjutan pada spektrum MS pada waktu retensi 18.535 menit menunjukkan M⁺232 yang memberikan informasi berat molekul senyawa pada isolat adalah 232.

2) Inframerah

Beberapa puncak serapan pada spektrum yang dihasilkan dari pengukuran spektroskopi IR menunjukkan pita serapan yaitu pada pita serapan sedang melebar di daerah 3410,15 cm⁻¹ menunjukkan adanya ikatan N-H. Pita serapan kuat dan tajam di daerah 1257,59 cm⁻¹ menunjukkan pita serapan ikatan C-N amina sekunder yang diperkuat oleh overton pada pita serapan 771,53 dan 686,66. Beberapa pita serapan pada 1997,06 cm⁻¹ sampai 1427,32 cm⁻¹ menunjukkan pita serapan ikatan C=C aromatik. Pita serapan tajam pada daerah 1681,93 cm⁻¹ ikatan C=O dan serapan sedang pada 1026,13 cm⁻¹ menunjukkan pita serapan dari ikatan C-O. Selanjutnya pita serapan lemah pada 292,09 cm⁻¹ dan 2846,93 cm⁻¹ merupakan pita serapan ikatan C-H gugus metilen dan metil (CH₃-CH₂-).

Identifikasi dengan pereaksi kima dan pengukuran spektroskopi menunjukkan bahwa senyawa yang ada pada isolat sebagai senyawa metabolit sekunder utama adalah senyawa yang bersifat polar, senyawa golongan alkaloid, dan memiliki kromofor atau elektron bebas terkonyugasi. Kromofor yang menyebabkan senyawa berpijar dibawah sinar UV 256 nm dapat dijelaskan dengan adanya cincin benzena dan pasangan elektron bebas pada gugus karbonil dan amina sekunder pada cincin sikloheksana yang dapat terdelokalisasi sehingga mampu menyerap pada daerah panjang gelombang UV tertentu. Pengukuran spektroskopi GS-MS seperti diuraikan di atas memberikan data pendukung yang menunjukkan adanya atom nitrogen heterosiklik sebagai ciri utama senyawa alkaloid yang menguatkan

bahwa isolat yang diperoleh dari fraksi B₈ adalah senyawa golongan alkaloid. Analisis fragmentasi senyawa mengacu pada *library data base* pada instrumen GS-MS-QP 2010S Shimadzu 70 EV menunjukkan pola frakmentasi isolat sama dengan senyawa alkaloid 5-etil-5-phenilpirimidin-2,4,6-trion (Gambar 1). Bobot molekul yang bernilai genap menunjukkan bahwa struktur senyawa tersebut mengandung atom nitrogen yang berjumlah genap.



Gambar 1. 5-etil-5-phenilpirimidin-2,4,6 trion

Spektrum IR juga memberikan dukungan data yang kuat dengan adanya pita serapan ikatan N-H, gugus C-N amina sekunder, C=C aromatik, C=O karbonil, dan metil dan metilen, semua gugus ini ada pada senyawa 5-etil-5-phenilpirimidin-2,4,6-trion.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi B ekstrak kulit batang *Avicennia* spp. yang memiliki nilai $IC_{50} > 200$ $\mu\text{g/ml}$ dan persen sintaks atau viabilitas ikan uji lebih tinggi dengan konsentrasi senyawa 15-25 g/kg pakan melalui ujiantang dan berbeda nyata dengan 1-10 g/kg pakan pada Uji BNT 1%. Pada fraksi ini, telah ditemukan senyawa sebagai senyawa metabolit sekunder utama

yang diduga berperan sebagai komponen bioaktif yaitu 5-etil-5-phenilpirimidin-2,4,6-trion dengan rumus molekul $C_{12}H_{12}N_2O_3$, berat molekul 232. Senyawa ini adalah golongan alkaloid bersifat polar berupa serbuk kristal berwarna putih dengan titik leleh 172°C .

SARAN

Untuk melengkapi hasil penelitian diperlukan analisis spektroskopi ^1H NMR dan ^{13}C NMR untuk mendapatkan struktur lengkap senyawa alkaloid yang sudah teridentifikasi, dan mempelajari aktivitas biologi senyawa alkaloid yang diperoleh agar diketahui potensinya sebagai bahan bioaktif untuk penanggulangan penyakit infeksi pada ikan budidaya khususnya pada bakteri *A. Hydrophyla*.

DAFTAR PUSTAKA

- Alimuddin A dan Rante H. 2006. *Uji Toksisitas Ekstrak Daging Siput Bakau Terhadap Artemia salina Leach*. Jurnal Farmasi dan Farmakologi. Vol 10 No. 1.
- Alimuddin A dan Linda H. 2007. *Isolasi Senyawa Antimikrobia dari Nipah (Nypa fructicans) dan Karakterisasi Parsial Senyawa Aktifnya Secara KLT-Bioautografi*. Laporan Hasil Penelitian.
- Angka SL, Yunita I, Utama IKJ. 2002. *Aktivitas Antibakteri dari Fitofarmaka secara In Vitro dan In Vivo terhadap Aeromonas hydrophila pada Ikan Lele Dumbo*. Jurnal Mikrobiologi Indonesia. 7: 47-50.
- Bandaranayake WM. 1998. *Tradisional and Medical Uses of Mangrove*. Mangrove and Salt Marshes. 2: 133-148.
- Burrens NS, Clement JJ. 1993. *Biomedical Potensial Marine Natural Product, Edited by Atawwa et al.(I): Phamaceutical and Bioactive Natural Product*. Plenum Press, New York and London: 13-14.

Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder Utama Ekstrak Etanol Kulit Batang Avicennia spp.

- Darminto, Alimuddin A, Iwan D. 2009a. *Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Potensial Menghambat Pertumbuhan Bakteri Aeromonas hydrophyla dari Kulit Batang Tumbuhan Avicennia sp*". *Chemica*. 10: 92-98.
- Darminto, Alimuddin A, Iwan D. 2009b. *Potensi Ekstrak Etanol Kulit batang Tumbuhan Mangrove (Avicennia spp) dalam Menghambat Pertumbuhan bakteri Aeromonas hydrophyla*". *Bionature*. 10: 56-59.
- Darminto, Alimuddin A, Iwan D. 2010. *Kajian Pengembangan dan Produksi Kandidat Fitofarmaka Antibakterial pada Tumbuhan Mangrove untuk Penanggulangan Penyakit Bakterial Ikan*. Laporan Hasil Penelitian Hibah Bersaing. Lembaga Penelitian UNM Makassar.
- Darminto, Alimuddin A, Iwan D. 2011. *Kajian Pengembangan dan Produksi Kandidat Fitofarmaka Antibakterial pada Tumbuhan Mangrove untuk Penanggulangan Penyakit Bakterial Ikan (Tahap Penentuan Senyawa Metabolit Sekunder Utama)*. Laporan Hasil Penelitian Hibah Bersaing. Lembaga Penelitian UNM Makassar.
- Doyle MP dan Mungall WS. 1986. *Experimental Organic Chemistry*. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Linington RG, Roberstson MG, Gauthier A, Finlay BB, Soest R, Anderson RJ. 2002. *Caminoside, An Antimicrobial Glycolipid Isolated from the Marine Sponges Caminus spaeroconia*. *Org Lett*. Nov 14 Nov. 23: 4089-4092.
- Purnobasuki H. 2004. *Potensi Mangrove sebagai Tanaman obat*. *Biota* 9: 125-126.
- Spalding MD, Ravilious C, Green EP. 2001. *Worlds Atlas of Coral Reefs*. University of California Press. Berkeley, USA.